ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุการเน่าเสียของผลไม้และเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน

Efficacy of Antagonistic Microorganism and Its Substances to Inhibit Fruit Spoilage Fungi and Aflatoxin Produced Fungi

นันทิดา ทัศพร และ วราภา มหากาญจนกุล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 02-562031 โทรสาร 02-5625021 E-mail: fagwapm@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ทางการค้า (PICO ชนิดเหลว) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 8 ชนิดซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของผลไม้ ได้แก่ *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *C. gloeosporiodes*, *F. oxysporum* , *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. และเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* เมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดย PICO ชนิดผง ที่ความเข้มข้น 20,000 ppmหรือ 2% จะให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาคือ PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ 1 คืน ก่อนนำสารละลายมาทดสอบความเข้มข้น 100 ppmหรือ 0.01% และ 250 ppmหรือ 0.025% และPICO ชนิดเหลวความเข้มข้น 2,000 ppm หรือ 0.2% ตามลำดับ ซึ่งอัตราการยับยั้งทั้งหมดนี้กำหนดว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้มากกว่าร้อยละ 50 ยกเว้นเชื้อ *A. niger* ที่สามารถต้านทานต่อการยับยั้งของสภาวะที่ใช้ทดสอบได้ดีที่สุด ส่วนสารประกอบที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราค่อนข้างต่ำแม้จะใช้ความเข้มข้นที่สูงในการทดสอบ คือ 50,000 ppm หรือ 5% และ100,000 ppmหรือ 10% โดย crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสายพันธุ์ KUB-AC16 เล็กน้อย

บทนำ

เชื้อราเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการสูญเสียของผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนั้นบางชนิดยังสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ เช่น อะฟลาทอกซิน โอคราทอกซิน พาตูลิน เป็นต้น การใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide) เป็นวิธีการที่นิยมและให้ผลดีในการลดและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แต่ก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีอันตรายตกค้างในผลิตภัณฑ์ (จริงแท้, 2538) รวมไปถึงกระแสประเทศผู้ซื้อห้ามมิให้ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในอาหารที่นำเข้าสูงขึ้น เพื่อป้องกันปัญหาสารตกค้างที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและส่งผลถึงการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย

ได้มีการพยายามลดและยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยชีววิธี ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonists) หรือสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น สารประกอบที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะเซททิลและแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Schillinger et al, 1996) มีรายงานว่าบางวิธีสามารถลดและยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และ/หรือช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารบางชนิดได้

จึงเป็นวิธีการที่น่าจะนำมาทดแทนการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราได้ เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และผู้บริโภครวมทั้งสิ่งแวดล้อมมากกว่า การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่จำหน่ายทางการค้า (PICO ชนิดผง), สารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่จำหน่ายทางการค้า (PICO ชนิดเหลว) และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุการเน่าเสียในผลไม้ และเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน เพื่อที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคและการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. <u>การเตรียมเชื้อราสำหรับทดสอบ</u>

เตรียมเชื้อราทดสอบ 8 ชนิด จาก BIOTECH Culture Collection (BCC), ประเทศไทย ซึ่งแบ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราสาเหตุการเน่าเสียในผลไม้ ได้แก่ *Alternaria* sp. (BCC8207), *Aspergillus niger* (BCC5772), *Colletotrichum gloeosporiodes* (BCC13327), *Fusarium oxysporum* (BCC5788), *Pestalotiopsis* sp. (BCC11319) และ *Phomopsis* sp. (BCC12583) ส่วนอีกกลุ่มเป็นตัวแทนของเชื้อราที่สามารถผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ ได้แก่ *A. flavus* (BCC9167) และ *A. parasiticus* (BCC5773) เพาะเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA, Merck, Dermstadt, Germany) เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm3^{\circ}C$)

2. <u>การเตรียมสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16</u> (Torriani et al., 1997)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคแต่ละสายพันธุ์ stock culture 1 ลูป ลงใน MRS broth 10 มิลลิลิตร เพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นจึงปิเปตสารละลายที่มีเซลล์เจริญปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth 100 มิลลิลิตร เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยการหมุนเวี่ยงที่ความเร็ว 13,000x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 10°C นำสารละลายใส (supernatant) ที่แยกได้มากรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อความพรุน 0.22 ไมโครเมตร จะได้สารประกอบที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก (crude extract) สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

3. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของ PICO ชนิดผง, PICO ชนิดเหลว และ crude extractของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ 8 ชนิดด้วยวิธี poisoned food technique</u> (วิชัยและชวเลิศ, 2546)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่มีการผสมสารทดสอบให้มีความเข้มข้นดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (ตัวอย่างควบคุม)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ผสม PICOชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 500, 1,000 และ 2,000 ppm (หรือ 0.05%, 0.1% และ 0.2%)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ผสม PICOชนิดผงให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20,000 ppm (หรือ 0.2%)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ผสม PICOชนิดผงที่แช่ในน้ำ 1 คืนก่อนนำมาทดสอบด้วยอัตราส่วน 5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 และ 250 ppm (หรือ 0.01% และ 0.025%)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ผสม crude extract ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ KUB-AC5 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50,000 และ 100,000 ppm (หรือ 5% และ 10%)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ผสม crude extract ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ KUB-AC16 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50,000 และ 100,000 ppm (หรือ 5% และ 10%)

จากนั้นนำเชื้อราที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบโดยเจาะเส้นใยบริเวณรอบของโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร ย้ายชิ้นวุ้นนั้นวางลงบริเวณกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารทดสอบ โดยให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับอาหารทดสอบ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

(30±3°C) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารผสมสารทดสอบเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (ตัวอย่างควบคุม) คำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญ

เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญ = (A – B) / A x 100

A = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร MEA (ตัวอย่างควบคุม)

B = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร MEA ผสมสารทดสอบ

<u>ผลการทดลองและวิจารณ์</u>

การทดสอบประสิทธิภาพของ PICO ชนิดผง, PICO ชนิดเหลว และ crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 8 ชนิดซึ่งแบ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราสาเหตุการเน่าเสียในผลไม้ ได้แก่ *Alternaria* sp., *A. niger*, *C. gloeosporiodes*, *F. oxysporum* , *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. ส่วนอีก 2 เชื้อเป็นตัวแทนของเชื้อราที่สามารถผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ด้วยวิธี poisoned food technique ผลการทดลองแสดงในรูป 1-8

เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราในตารางที่ 1 พบว่า PICO ชนิดผงที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Alternaria* sp., *A. niger* , *C. gloeosporiodes* , *F. oxysporum*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ร้อยละ 79.0, 61.4, 83.9, 80.5, 100.0, 100.0, 77.8 และ 70.0 ตามลำดับ โดยเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.และ *Phomopsis* sp. มีความอ่อนแอ PICO ชนิดผงมากที่สุด และเชื้อ *A. niger* สามารถต้านทานต่อการยับยั้งได้ดีที่สุด เมื่อนำ PICO ชนิดผงแช่ในน้ำด้วยอัตราส่วน 5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 1 คืนก่อนนำมาใช้ทดสอบเพื่อให้ PICO ชนิดผง ซึ่งก็คือ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผ่านกระบวนการลดความชื้นในการผลิตเป็นให้เป็นผงฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่มีความสมบูรณ์ พบว่าสามารถเจริญแข่งขันและสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าการใช้ในรูปผงแห้งโดยตรง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ 1 คืนที่ความเข้มข้น 100 และ 250 ppm ให้ผลในการยับยั้งที่ดีใกล้เคียงกับการใช้ PICO ชนิดผงที่ความเข้มข้นสูงถึง 20,000 ppm

และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพ PICO ชนิดเหลวซึ่งก็คือสารประกอบที่สร้างจุลินทรีย์ที่ผลิตในรูปของการค้าที่ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 ppm พบว่าที่ความเข้มข้น 2,000 ppm เท่านั้นที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่าร้อยละ 50 เกือบทั้งหมด ยกเว้นเชื้อ *A. niger* ที่ยับยั้งได้เพียงร้อยละ 8.4 อาจเนื่องมาจาก *A. niger* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนกรดได้ดี (สุมาลี, 2541) จึงสามารถต้านทานความเป็นกรดต่ำซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สารชนิดนี้ได้ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า PICO ชนิดผงมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่า PICO ชนิดเหลว ซึ่งเนื่องมาจาก PICO

ชนิดผงเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกทำให้แห้งเมื่อคืนสภาพปกติจะมีเซลล์ซึ่งสามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้ง นอกจากนั้นยังสร้างสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกด้วย ในขณะที่ PICO ชนิดเหลวได้ถูกกรองแยกเซลล์ออกไปแล้ว จึงมีแต่สารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์อยู่ในสารละลาย

ส่วนประสิทธิภาพ crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ 8 ชนิดนั้น พบว่า crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราค่อนข้างต่ำแม้จะใช้ความเข้มข้นที่สูงในการทดสอบ โดย crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสายพันธุ์ KUB-AC16 เล็กน้อย การที่ crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่ำอาจเป็นเพราะสารประกอบที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียมากกว่า เช่นมีการรายงานว่า *Lactobacillus caei* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophilia, L. monocytogenes, Salmonella* Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* (Torriani *et al*.,1997 และ Vescovo *et al*.,1996)

<u>ตารางที่ 1</u> ประสิทธิภาพของ PICOชนิดผง, PICOชนิดเหลว และ crude extractของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ 8 ชนิด

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (% Reduction)							
		Alternaria	*A. niger*	*F. oxysporum*	*C. gloeosoriodes*	*Pestalotiopsis*	*Phomopsis*	*A. flavus*	*A. parasiticus*
-ชุดควบคุม (control)	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
-PICO ชนิดเหลว	500	15.8	0.0	23.8	15.6	8.6	0.0	22.2	13.3
	1,000	32.9	3.6	25.3	40.3	42.9	100.0	57.1	35.6
	2,000	56.6	8.4	51.7	74.0	77.1	100.0	66.7	53.3
-PICO ชนิดผง	20,000	79.0	61.4	83.9	80.5	100.0	100.0	77.8	70.0
-PICO ชนิดผง (แช่น้ำก่อนทดสอบ 1 คืน)	100	78.8	44.4	60.3	91.3	100.0	100.0	66.7	58.9
	250	80.6	48.9	65.1	100.0	100.0	100.0	70.0	61.1
-Crude Extract ของ KUB-AC5	50,000	6.7	0.0	0.0	8.4	0.7	10.1	4.8	18.7
	100,000	10.5	1.3	20.7	33.4	3.6	12.1	11.1	32.9
-Crude Extract ของ KUB-AC16	50,000	4.8	0.4	2.2	0.0	5.8	11.6	4.8	8.5
	100,000	9.9	7.7	4.6	2.5	10.9	11.6	5.6	29.3

สรุปผลการทดลอง

PICO ชนิดผงและPICO ชนิดเหลวมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 8 ชนิดซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของผลไม้ ได้แก่ *Alternaria* sp., *A. niger*, *C. gloeosporiodes*, *F. oxysporum* , *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp.และเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* เมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดย PICO ชนิดผง ที่ความเข้มข้น 20,000 ppm จะให้ผลการยับยั้งดีที่สุด รองลงมาคือ PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ 1 คืน ก่อนนำมาทดสอบความเข้มข้น 100 ppm และ 250 ppm และPICO ชนิดเหลวความเข้มข้น 2,000 ppm ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้มากกว่าร้อยละ 50 จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำประยุกต์ใช้เพื่อลดการเน่าเสียและยืดอายุเก็บรักษาผักและผลไม้ และลดความเสี่ยงที่จะเกิดการสร้างสารพิษจากเชื้อราในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารสัตว์ หรือธัญพืชต่างๆได้ ส่วน crude extract ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KUB-AC5 และ KUB-AC16 นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ 8 ชนิดค่อนข้างต่ำจึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านนี้

<u>เอกสารอ้างอิง</u>

จริงแท้ ศิริพาณิช. 2538. **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 369 น.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล และ ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. 2546. การควบคุมโรคของแง่งขิงระหว่างการเก็บรักษาด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารสกัดจากพืช. **Postharvest Newsletter**. ปีที่2 ฉบับที่ 4 (ต.ค.-ธ.ค.).

สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. โรงพิมพ์ชัยเจริญ, กรุงเทพฯ. 248 น.

Schillinger, U., R. Geisen and W. H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7 : 158-164.

Torriani , S., C. Orsi and M. Vescovo. 1997. Potential of *Lactobacillus casei,* culture Permeate, and lactic acid to control microorganisms in ready-to-use vegetable. **J. Food Prot.** 60 : 1564-1567.

Vescovo, M., S. Torriani, C. Orsi, F. Macchiarolo and G. Scolari. 1996. Application of antimicrobail-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. **J. Appl. Bacteriol.** 81 : 113-119.

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินในอาหาร

Efficacy of Antagonistic Microoganism and Its Substances to Inhibit Aflatoxin Produced Fungi in Food.

นันทิดา ทัศพร และ วราภา มหากาญจนกุล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 02-562031 โทรสาร 02-5625021 E-mail: fagwapm@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ทางการค้า (PICO ชนิดเหลว) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสาร อะฟลาทอกซิน ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในตัวอย่างอาหารถั่วลิสงป่นและข้าวโพด-ป่นได้ โดย BIOWISH ชนิดเหลวความเข้มข้น 5%และ10% ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 6 $\log_{10}$ CFU/g ได้ทั้งหมดตลอด7 วันของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30$\pm$3°C) เมื่อลดความเข้มข้นลงเป็น 2.5% ประสิทธภาพการยับยั้งลดลงกว่าครึ่งในวันแรกของการเก็บรักษาและเชื้อราเจริญเพิ่มขึ้นจนมีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ 1 คืนก่อนนำมาใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในตัวอย่างอาหารเท่ากับ1.0%, 2.5% และ 5.0 % ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงป่นได้ทั้งหมด แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในถั่วลิสงป่นได้ตลอดทั้ง 7 วัน ส่วนข้าวโพดป่นนั้นที่ความเข้มข้น 2.5% และ 5.0% ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ทั้งหมดเช่นกัน ดังนั้น PICO ชนิดเหลวความเข้มข้น 5% จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อราสูง ได้แก่ ธัญพืชและวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้

บทนำ

อาหารแห้งที่มีความชื้นต่ำ ได้แก่ ธัญพืชและผลิตภัณฑ์ และเครื่องเทศ มักจะมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินและสิ่งแวดล้อมได้แก่ สปอร์ของแบคทีเรียบางชนิดและเชื้อรา ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และบางชนิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เชื้อราหลายชนิดสร้างสารพิษที่เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ได้ สารพิษจากเชื้อราที่สำคัญและเป็นที่รู้จักกันมากคือ อะฟลาทอกซิน *Aspergillus flavus, A. parasiticus และ A. nominus* เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ (สุมณฑา, 2545) มีผู้ทำการทดลองหาวิธีการลดปริมาณอะฟลาทอกซินหลายวิธี ตัวอย่างเช่น ใช้ 1% โซเดียมไบซัลไฟท์ เวลาสัมผัส 72 ชม. ลดอะฟลาทอกซินได้ 28.2%, 0.2%ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เวลาสัมผัส 10 นาทีแล้วนำไปผ่าน 1% โซเดียมไบซัลไฟท์ อะฟลา-ทอกซินลดลง 65.5 % และการใช้ความร้อนที่ 45-65 °C นาน 1 ชม.ลดอะฟลาทอกซินได้ 68.4% (Altug *et al*, 1990) นอกจากนั้นการนำเมล็ดฝ้ายที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินผ่านแอมโมเนีย แล้วนำไปเลี้ยงแม่วัว มีผลให้น้ำนมที่ได้มีอะฟลาทอกซินต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (Jorgenssen *et al*, 1990) อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีหรือความร้อนไม่สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ทั้งหมด และอาจทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีและการเปลี่ยนแปลงของอาหารในลักษณะที่ไม่ต้องการ การยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนก่อนจะสร้างสารพิษด้วยชีววิธีจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาการสร้างสารพิษของเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารระหว่างการเก็บรักษาได้ วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้ คือ ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ทางการค้า (PICO ชนิดเหลว)ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน โดยทดลองในตัวอย่างอาหารถั่วลิสงป่นและข้าวโพดป่น เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อลดโอกาสการสร้างสารพิษจากเชื้อราในอาหารระหว่างการเก็บรักษา

<u>อุปกรณ์และวิธีการทดลอง</u>

<u>อุปกรณ์</u>

1. <u>จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

เชื้อราตัวแทนที่สามารถผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ ได้แก่ *A. flavus* (BCC9167) และ *A. parasiticus* (BCC5773) BIOTECH Culture Collection (BCC), กรุงเทพฯ

2. <u>วัตถุดิบ</u>

ถั่วลิสงคั่วป่นและเมล็ดข้าวโพดป่น จากร้านค้าในตลาดอมรพันธ์ บางเขน, กรุงเทพฯ

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. <u>การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อรา</u>

เพาะเชื้อรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA, Merck, Germany) ที่อุณหภูมิห้อง (30±3°C) เป็นเวลา 4 วัน ปิเปตน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มล. ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้แท่งแก้วงอขูดเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราให้หลุดออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดูดขึ้นจากจานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้ซ้ำอีกครั้งจะได้สารแขวนลอยของเชื้อรา (สกลวัฒน์, 2543)

2. <u>การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อราของ PICO ชนิดผงและ PICO ชนิดเหลว</u>

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำถั่วลิสงป่นและข้าวโพดป่นมานึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 30 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วแบ่งใส่ถุงโพลิเอทิลีนตัวอย่างละ 10 กรัม

2.2 การสร้างการปนเปื้อนเชื้อราในตัวอย่างอาหาร

ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อรา*A. flavus* ลงในตัวอย่างถั่วลิสงป่นและข้าวโพดป่นที่บรรจุในถุงโพลิเอทิลีน 1 มล./ถุง ทั้งหมด 35 ถุง คลุกผสมให้ทั่วกันทั้งถุง สำหรับเชื้อรา *A. parasiticus* ทำแบบนี้เช่นกัน จากนั้นนำไปเติมสารทดสอบดังนี้

1) ไม่เติมสารทดสอบ
2) เติม PICO ชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในตัวอย่างอาหารเท่ากับ 2.5%, 5.0% และ 10.0% ตามลำดับ
3) เติม PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ 1 คืนก่อนนำมาใช้ด้วยอัตราส่วน 5, 10, 25 และ 50 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรตามลำดับ แล้วนำผสมกับตัวอย่างอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05%, 1.0%, 2.5% และ 5.0% ตามลำดับ

หลังจากผสมตัวอย่างอาหารและสารทดสอบให้ทั่วถึงแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±3°C) เก็บตัวอย่างตรวจปริมาณเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่เจริญในตัวอย่างอาหาร ณ วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ของการเก็บรักษา

3. <u>การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจผล</u>

เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาจำนวนเชื้อรา *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* โดยเติมสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 90 มล.ลงในถุงที่บรรจุตัวอย่างอาหาร ตีป่นด้วยความเร็วต่ำนาน 2 นาที ทำการเจือจางสารละลายที่ได้จนถึงระดับที่เหมาะสมแล้วปิเปต 0.1 มล.ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±3°C) เป็นเวลา 4 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 15-150 โคโลนี

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อสร้างการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่าจำนวนเชื้อราเริ่มต้นในข้าวโพดป่นมีปริมาณมากกว่าในถั่วลิสงป่น (ตารางที่ 1 และ 2) ซึ่งอาจเนื่องมาจากข้าวโพดป่นมีลักษณะทางกาย

ภาพที่มีซอกมุมมากกว่าและมีความชื้น (ค่า A_w ของข้าวโพดป่นเท่ากับ 0.72 ส่วนค่า A_w ของถั่วลิสงป่นเท่ากับ 0.56) สูงกว่าถั่วลิสงป่น จึงเอื้ออำนวยให้เชื้อราเกาะติดและเจริญในข้าวโพดป่นสูงกว่าถั่วลิสงป่น

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ทางการค้า (PICO ชนิดเหลว) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในตัวอย่างอาหารถั่วลิสงป่นและข้าวโพดป่นได้ดังตารางที่ 1 และ 2 โดย PICO ชนิดเหลวความเข้มข้น 5%และ10% ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 6 $\log_{10}$CFU/g ได้ทั้งหมดตลอด 7 วันของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ห้อง (30$\pm$3°C) เมื่อลดความเข้มข้นลงเป็น 2.5% ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงกว่าครึ่งในวันแรกของการเก็บรักษา และเชื้อราเจริญเพิ่มขึ้นจนมีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา ส่วน PICO ชนิดผงที่แช่น้ำ 1 คืนก่อนนำมาใช้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในตัวอย่างอาหารเท่ากับ 0.05% สามารถลดเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ 2 - 3 $\log_{10}$ CFU/g จากนั้นจะเพิ่มจำนวนจนใกล้เคียงจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 3 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0%, 2.5% และ 5.0 % ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงป่นได้ทั้งหมด แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในถั่วลิสงป่นได้เพียง 1 วัน จากนั้นเชื้อราจะเพิ่มจำนวนเท่ากับ 2 - 4 $\log_{10}$CFU/g ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา และถูกกลุ่มเส้นใยสีขาวซึ่งอาจเป็นการเจริญของจุลินทรีย์จาก PICO ชนิดผงเองเจริญปกคลุมหนาแน่นจนไม่สามารถตรวจนับจำนวนได้ในวันที่ 5

ส่วนข้าวโพดป่นนั้นที่ความเข้มข้น 2.5 % และ 5.0 % ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ทั้งหมด แต่ลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้เพียง 1-3 $\log_{10}$CFU/g ในวันแรกของการเก็บรักษา และถูกกลุ่มเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมหนาแน่นจนไม่สามารถตรวจนับจำนวนได้ในวันที่ 5 เช่นกัน

<u>ตารางที่ 1</u> จำนวนเชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญในตัวอย่างอาหารที่เติมและไม่เติมPICO ผงและชนิดเหลว

ตัวอย่างอาหาร	ความเข้มข้น PICO (%)		จำนวนเชื้อรา *A. flavus* ($\log_{10}$CFU/g)				
	ชนิดเหลว	ชนิดผง	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
ถั่วลิสงป่น			6.1	5.8	5.6	5.4	5.1
	2.5		3.2	3.8	6.9	NT	NT
	5.0		0	0	0	0	0
	10.0		0	0	0	0	0
		0.05	3.4	7.5	NT	NT	NT
		1.0	0	0	0	spr	spr
		2.5	0	0	0	spr	spr
		5.0	0	0	0	spr	spr

ข้าวโพดป่น			7.2	7.3	5.7	7.3	NT
	2.5		4.9	5.3	6.9	NT	NT
	5.0		0	0	0	0	0
	10.0		0	0	0	0	0
		0.05	4.2	4.4	7.9	NT	NT
		1.0	3.8	4.0	3.4	spr	spr
		2.5	3.4	3.3	3.0	spr	spr
		5.0	5.1	5.5	3.1	spr	spr

<u>หมายเหตุ</u> จำนวนเชื้อรา *A. flavus* เริ่มต้น 6.9 $\log_{10}$CFU/g

NT คือสังเกตเห็นเชื้อรา *A. flavus* เจริญด้วยตาเปล่าจึงไม่ตรวจหาจำนวนเชื้อรา

spr คือสังเกตเห็นกลุ่มเส้นใยสีขาวเจริญหนาแน่นจึงไม่ตรวจหาจำนวนเชื้อรา

A_w ของถั่วลิสงป่น ที่อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 0.56

A_w ของข้าวโพดป่น ที่อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 0.72

<u>ตารางที่ 2</u> จำนวนเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญในตัวอย่างอาหารที่เติมและไม่เติม PICO ชนิดผงและชนิดเหลว

ตัวอย่างอาหาร	ความเข้มข้น PICO (%)		จำนวนเชื้อรา *A. parasiticus* ($\log_{10}$CFU/g)				
	ชนิดเหลว	ชนิดผง	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
ถั่วลิสงป่น			6.7	6.5	6.2	6.4	6.3
	2.5		3.7	4.1	4.8	NT	NT
	5.0		0	0	0	0	0
	10.0		0	0	0	0	0
		0.05	2.5	2.7	5.7	NT	NT
		1.0	0	0	4.0	spr	spr
		2.5	0	0	3.3	spr	spr
		5.0	0	0	2.5	spr	spr
ข้าวโพดป่น			5.9	6.0	6.0	6.9	NT
	2.5		4.2	4.5	6.2	NT	NT
	5.0		0	0	0	0	0
	10.0		0	0	0	0	0
		0.05	3.8	4.6	6.8	NT	NT

1.0	3.1	3.6	4.0	spr	spr
2.5	0	0	0	spr	spr
5.0	0	0	0	spr	spr

<u>หมายเหตุ</u> จำนวนเชื้อรา *A. parasiticus* เริ่มต้น 6.8 $\log_{10}$CFU/g

NT คือสังเกตเห็นเชื้อรา *A. parasiticus* เจริญด้วยตาเปล่าจึงไม่ตรวจหาจำนวนเชื้อรา

spr คือสังเกตเห็นกลุ่มเส้นใยสีขาวเจริญหนาแน่นจึงไม่ตรวจหาจำนวนเชื้อรา

A_w ของถั่วลิสงป่น ที่อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 0.56

A_w ของข้าวโพดป่น ที่อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 0.73

สรุปผลการทดลอง

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทางการค้าในรูปผงแห้ง (PICO ชนิดผง) และสารประกอบที่สร้างจากจุลินทรีย์ทางการค้า(PICO ชนิดเหลว) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสาร อะฟลาทอกซิน ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในตัวอย่างอาหารถั่วลิสงป่นและข้าวโพด-ป่นได้

ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีแนวโน้มไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสาร อะฟลาทอกซินเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อราสูง ได้แก่ ธัญพืช อาหารแห้ง และวัตถุดิบอาหารสัตว์ เป็นต้น คือ PICO ชนิดเหลวความเข้มข้น 5% ทั้งนี้จำเป็นต้องศึกษาถึงวิธีการผสมให้ทั่วถึงและปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิ สภาวะออกซิเจน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราให้ได้มากที่สุดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สุมณฑา วัฒนสินธุ์.2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**.โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์,กรุงเทพฯ. 470 น.

Altug, T., A.E. Yousef, and E.H. Marth. 1990. Degradation of aflatoxin B_1 in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. **J. Food Prot.** 53: 581-582.

Jorgenssen, K.V., D.L. Park, S,M, Rua. 1990. Reduction of mutagenic potentials in milk: Effect of ammonium treatment on aflatoxin-contaminated cotton-seed. **J. Food Prot.** 53: 777-778.

การทดสอบประสิทธิภาพของ PICO® ในการทำลายสารพิษ Aflatoxin

สารพิษ Aflatoxin เป็นสารพิษที่มักปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรอยู่เสมอ เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด อาหารสัตว์ต่างๆ หากได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณสูงอาจจะทำให้เกิดอันตราย ทั้งยังเป็นการลดคุณภาพของผลผลิต การตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin(AFT) สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) วิธีทางอิมมูโน เช่น Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PICO® เป็นสารอินทรีย์สามารถใช้ในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียในพืช รวมทั้งผลผลิตจากพืช ผัก ผลไม้ ต่างๆ สำหรับความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ในการแช่ผักผลไม้คือ 20 – 40 ml/L water (2 – 4 %) ประกอบด้วยกรดหลายชนิด ได้แก่ lactic acid, succinic acid, acetic acid, butyric acid, formic acid, enzyme และสารปฏิชีวนะ

ในการทดลองครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของ PICO® ในการลดสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยจะใช้การทดสอบด้วยวิธีอิมมูโน ได้แก่วิธี ELISA ตามวิธีการของฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งม.ก. หรือ KU-AF01 (Direct competitive ELISA) เนื่องจากเป็น screening test มีความรวดเร็ว และประหยัด แต่อย่างไรก็ตาม KU-AF01 เป็นวิธีที่ใช้คัดเลือกวัตถุดิบหรืออาหารที่มีการปนเปื้อน Aflatoxin โดยปรกติ detection limit จะให้ค่าเที่ยงตรงในช่วง 4 – 40 ppb และตามข้อกำหนดของประเทศไทยที่ยอมให้มี Aflatoxin ปนเปื้อนในอาหารปัจจุบัน กำหนดไม่ให้เกิน 15 ppb ส่วนในอาหารสัตว์ยอมให้ได้ 20 – 100 ppb จึงได้ศึกษาการลดสารพิษในช่วง 0 – 100 ppb

สารเคมี

1. AFT-BSA conjugated 0.5 µg/mL
2. Aflatoxin B_1 solution 0, 20, 40, 60 และ 100 ppb
3. PICO® solution (dilute with water) 0, 5, 10, 20 และ 50 %
4. Antibodies-horseradise peroxidase conjugated
5. O-phenylammine (substrate buffer)

วิธีการทดลอง

I. การผสม PICO® กับ Toxin solution

ผสม PICO® solution 0, 5, 10, 20 และ 50 % กับ toxin ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 100 ppb ในอัตราส่วน 0.5 mL : 0.5 mL

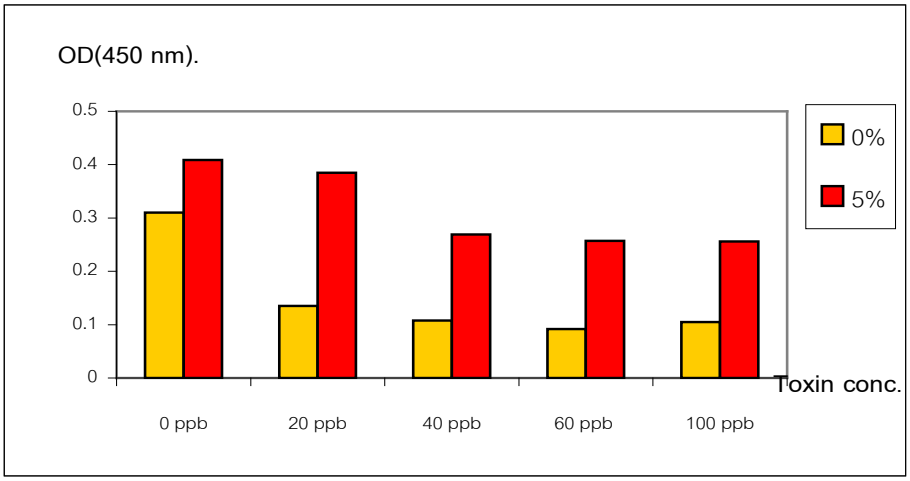
ทำชุด control โดยเปลี่ยน PICO® solution เป็นน้ำกลั่น 0.5 mL ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

II. การวิเคราะห์ด้วย direct competitive ELISA method

1. เคลือบ microplate ด้วย AFT-BSA conjugated
2. เติม antibodies –horseradish conjugated ลงใน plate แล้วเติมสารละลายของ toxin ที่ผสมกับ PICO® solution ลงใน plate ทันที
3. เติม substrate
4. วัด Optical density(OD) ที่ 450 nm

III. ทำการทดสอบในช่วงเดือน พฤศจิกายน-ธันวาคม 2546

ผลการทดลอง



<u>รูปที่ 1</u> ค่า Optical density ที่ 450 nm ของสารละลาย toxin ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 100 ppb ที่ผสมกับ PICO® solution และไม่ได้ผสม จากการทดลอง 2 ซ้ำ

สรุปผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA หากมี toxin ในตัวอย่างมาก จะได้ค่าOptical density (OD)น้อยลง ดังนั้น หาก ญณฉฯ® solution สามารถสลาย (degrade) toxin ได้ ค่า OD ที่ได้ควรจะมีค่าเพิ่มขึ้น

จากผลการทดลอง พบว่าในสารละลายที่มี PICO® solution และ toxin มีค่า OD เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มี PICO® solution ดังแสดงในรูปที่ 1 PICO® solution สามารถสลายปริมาณ toxin ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 100 ppb
แต่เนื่องจากส่วนประกอบสารอินทรีย์ใน PICO® solution มีหลายชนิด ในที่นี้จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า toxin ถูกทำลายได้อย่างไร เมื่อทดลองใช้น้ำกลั่นที่มีการปรับ pH (ด้วย HCl) ที่เท่ากับ PICO® solution (pH 2.4) พบว่า ปริมาณ toxin ลดลงเช่นกัน ซึ่งแสดงว่าน่าจะเป็นผลจาก pH ของสารละลายเนื่องจาก Aflatoxin ถูกสลาย ได้ที่ pH ต่ำ สำหรับการคำนวณปริมาณ toxin ที่ลดลงควรจะใช้การทดสอบด้วย official method เช่น HPLC with Immunoaffinity column จะให้ผลที่แน่นอนกว่าวิธี screening เช่น ELISA

อนึ่งเป็นที่สังเกตว่า กรดใน PICO® solution อาจรบกวนการทำงานของระบบ ELISA (KU-AF01) เพราะในตัวอย่างควบคุม (ที่ไม่มีสารพิษ แต่มี PICO® solution) พบว่าค่า OD ของตัวอย่างที่มี PICO® solution มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่มี buffer (หรือ 0 ppb toxin)

ประสิทธิภาพของ BIOWISH ชนิดเหลวในการลดจำนวน
***S.* Typhimurium ที่ปนเปื้อนบนผักสด**

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S.* Typhimurium บนผักกาดหอมที่แช่ในสารละลาย Biowish ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น % (v/v)	เวลา (นาที)	จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต (log CFU/ml)	
		จุลินทรีย์ทั้งหมด	*S.* Typhimurium
0.1%	0	5.83	4.04
	15	5.18	2.74
	30	4.71	2.88
0.2%	0	5.83	4.04
	15	4.11	2.84
	30	4.79	2.18
0.4%	0	5.83	4.04
	15	4.00	2.58
	30	4.97	2.66
น้ำกลั่น pH 4	0	5.83	3.60
	15	4.28	3.04
	30	4.32	3.43